



α 干扰素及其他制剂干预 肝癌转移复发和肿瘤生长的实验研究

Experimental Studies on Inhibition of Metastasis and Tumor Growth
of Hepatocellular Carcinoma Using Interferon-alpha and Other Agents

王 鲁



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS



α 干扰素及其他制剂干预 肝癌转移复发和肿瘤生长的实验研究

Experimental Studies on Inhibition of Metastasis and Tumor Growth
of Hepatocellular Carcinoma Using Interferon-alpha and Other Agents

王 鲁



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS

图书在版编目 (CIP) 数据

α 干扰素及其他制剂干预肝癌转移复发和肿瘤生长的
实验研究 / 王鲁. —北京:高等教育出版社,2004.6

ISBN 7-04-015052-2

I. α ... II. 王... III. 干扰素-临床应用-肝脏
肿瘤-肿瘤转移-研究 IV. R735.7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 017848 号

策划编辑	杨 兵	责任编辑	席 雁	封面设计	张 楠
责任绘图	朱 静	版式设计	史新薇	责任校对	康晓燕
责任印制	韩 刚				

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-64054588
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100011	网 址	http://www.hep.edu.cn
总 机	010-82028899		http://www.hep.com.cn

经 销 新华书店北京发行所
印 刷 高等教育出版社印刷厂

开 本	850 × 1168 1/32	版 次	2004 年 6 月第 1 版
印 张	3.5	印 次	2004 年 6 月第 1 次印刷
字 数	90 000	定 价	8.30 元
插 页	2		

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

作者简介



王鲁,男,1968年10月出生。2000年毕业于复旦大学获医学博士学位。目前为复旦大学附属中山医院肝外科副主任医师。

有数百例肝脏手术及数十余例肝移植手术经验,包括肝门区肝癌、巨大肝癌切除、门静脉主干癌栓切取、下腔静脉癌栓切取、全尾状叶切除等高、难手术。曾赴世界活体肝移植中心之一的香港大学医学中心玛丽医院肝胆胰外科接受培训,参加活体肝移植等手术。

科研以肝癌转移的干预为重点,论文分别发表在包括国际肝病学影响因子最高的专业杂志“Hepatology”,“J Gastrointestinal Surg”(主编特加序言予以介绍)在内的国内外学术期刊上。

负责国家自然科学基金、复旦大学青年科技基金、国家优秀博士基金资助课题,参加国家重点基础研究规划项目(973)、“863”、“十五攻关”等科研项目。先后获得全国优秀博士毕业论文;上海市科技进步二等奖;中华医学科技二等奖;2002年世界消化外科协会 Grassi 奖。

目前为中国抗癌协会肝癌专业委员会会员;世界华人消化杂志编委。

导师简介



汤钊猷,男,广东人,1930年12月出生,复旦大学肝癌研究所(原上海医科大学肝癌研究所)所长,中华医学会副会长,中国工程院院士。曾任上海医科大学校长,国际抗癌联盟(UICC)理事,国家教委科技委员会副主任委员,中国工程院医药卫生学部主任,中华医学会肿瘤学会副主委,中国抗癌协会肝癌专业委员会主委。

汤教授领导他的集体对肝癌的早期发现、早期诊断和早期治疗的各个环节进行系统研究,取得瞩目的成绩。他在国际上最早系统提出“亚临床肝癌”的概念和理论。同时在不能切除肝癌的缩小后切除,肝癌的导向治疗研究,肝癌复发转移的初步研究等方面都取得可喜的成果。

获国家科技进步一等奖1项、三等奖2项,卫生部一等奖及上海市科技进步一等奖等多项,新中国成立以来医药科技成果金杯奖;何梁何利科技进步奖,中国医学科学奖,中国工程科技奖。

作为大会主席主办四届上海国际肝癌肝炎会议,七届全国肝癌会议。应邀出席70个国际学术会议作报告。15届和16届国际癌症大会中的肝癌分组会任共同主席和主席。

先后任10本国外专业杂志编委,其中二本任亚太区共同主编;主编书7本,论文494篇(英文发表百余篇)。

论文提要

寻找预防治疗转移复发的有效药物为改善肝癌预后所急需。论文以世界上首先建立的裸鼠人肝癌转移模型 LCI - D20 为研究工具,在检验多种药物基础上证实大剂量长疗程 IFN - α 能预防肝癌术后的转移复发及肿瘤生长,呈剂量效应关系,这一结果为国内外首次报道。

通过检验 IFN - α 分别对肝癌细胞株包括人高转移肝癌细胞株 MHCC97 和人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 的增殖、移动的作用;对裸鼠角膜形成新生血管作用揭示 IFN - α 主要通过抑制肿瘤血管形成而起作用。

检测 IFN - α 治疗后血清及组织标本中相关血管形成因子蛋白和核酸的表达,证实在肝癌中 IFN - α 主要抑制 VEGF 而非 bFGF 的产生,从而阻断肝癌血管形成。一氧化氮在肝癌血管形成过程中与 VEGF 有协同作用。

前 言

原发性肝癌,主要为肝细胞癌,是亚、非洲最常见的恶性肿瘤之一,每年全世界因肝癌导致约 30 万人死亡^[1]。在中国,肝癌分别是男、女性因恶性肿瘤致死的第二和三位原因^[2,3],占全球肝癌死亡数的 45% 左右^[4]。外科手术切除是主要的治疗手段。但肝癌根治性切除术后的复发率高达 60% ~ 80%^[5~7],并且大约 80% 的肝癌病人在诊断后肿瘤已不能切除,其中位生存期仅为 3.1 个月^[8,9]。肝癌术后较高的复发率及大多数的肝癌不能手术是进一步改善肝癌预后的重大障碍。

肿瘤转移是一个多步骤的复杂过程,肿瘤细胞由于基因的改变如癌基因的上调和抑癌基因的下调而获得转移表型。转移过程由一系列基因产物调节,包括细胞间和细胞及细胞外基质受体;侵袭基底膜、血管及周围器官所需的蛋白降解酶类;穿过组织所需的移动因子;生长因子促进肿瘤克隆生长和肿瘤血管形成。肿瘤血管形成支持肿瘤细胞生长并导致肿瘤血行转移。

最近发展起来的抗转移药物按照阻断转移过程的不同环节可分为抗粘附治疗药物、抑制细胞外基质降解的药物、抗移动治疗的药物、抗肿瘤细胞信号传导的药物、抑制肿瘤血管形成的药物、肿瘤转移的基因调控以及其他方面机制的药物等。

近年虽有较多的关于实验及临床应用的防治肝癌转移复发药物的报道^[4,10~16],但目前处于实验探索的抗转移药物尚未进入临床,而临床应用的药物其疗效及作用机制尚不肯定,因此寻找可直接应用于临床或短期内即可上临床的有效药物对改善肝癌患者的预后具有重要的意义。

本课题的指导思想是实验设计尽可能接近临床需求,以原位移植的裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)^[17]为工具,模拟根治性

切除后预防复发为目标,选用已在临床应用的或易于批准上临床的药物;针对转移复发分子机制所涉及的不同环节进行实验性干预来寻找有效的抑制肝癌转移复发及肿瘤生长的生物治疗药物,特别值得注意的是肝癌血管结构特殊,血供丰富,是典型的多血管肿瘤^[18],针对肿瘤血管形成的干预对抑制肝癌转移复发可能有特殊意义;通过不同药物联合或序贯干预与单一环节干预效果的比较,以找出相加或相乘的效果。争取对一些已在临床应用的药物探索其潜在抗转移作用,筛选出具有实际应用价值者,为临床预防肝癌术后转移复发用药提供参考。并通过对其作用机制的研究推动肝癌转移复发机制的研究。

中文摘要

原发性肝癌是亚、非洲最常见的恶性肿瘤之一,全世界每年因肝癌而死亡的人数约为 30 万。手术切除是重要的治疗手段,由于术后较高的复发率和大多数肝癌患者诊断时已不能手术,肝癌的预后差。肝癌对化疗不敏感,目前对肝癌转移复发有抑制作用的实验性干预药物难以上临床。肝癌转移是多步骤的过程,针对肝癌转移复发分子机制的生物治疗药物是干预的重要方向,肝癌是典型的多血管肿瘤,其复发与肿瘤血管形成有关,抗肿瘤血管形成治疗对肝癌转移复发的干预有特殊意义。寻找有效的抗肝癌转移复发的药物,对一些已在临床应用的药物探索其潜在的抗转移作用,筛选出具有实际应用价值者为临床直接应用,将极大地改善肝癌患者的预后,并通过对其作用机制的研究推动肝癌复发机制的研究。我们通过裸鼠人肝癌转移模型 LCI - D20 观察了多种药物对根治性切除移植瘤后的及未切肿瘤的荷瘤裸鼠的转移复发率、肿瘤生长和生存时间的疗效。这些药物包括 droloxifene、2 - 羟基氟他胺 (futamine)、全反式维甲酸 (ATRA)、 α 干扰素 (IFN - α)。发现 droloxifene、2 - 羟基氟他胺、ATRA 对根治性切除术后肝癌的转移复发及肿瘤生长无抑制作用,而大剂量长疗程 IFN - α 可明显抑制肝癌的复发转移和肿瘤生长。其有效剂量按体表面积计算相当于人 5.5 MU,每周 3 次,为临床应用提供了参考。进一步的实验证实,IFN - α 是通过抑制 VEGF 而非 bFGF 的产生,从而阻断肝癌的肿瘤血管形成达到上述作用。

Abstract

Hepatocellular carcinoma is one of the most common malignancies in Asia and Africa. It was estimated to 315 000 cases worldwide per year. Although the surgical resection is the first treatment of choice, unfortunately, the survival rate for HCC after resection remains low because of the high recurrent rate, only 9% ~ 27% of patients with HCC are suitable for resection. HCC is generally not sensitive to chemotherapy. Although there were a lot of drugs reported could inhibit recurrence and metastasis of HCC, however, most of them have not yet applied to patients. The metastasis of HCC is a multistep process, biottherapy that targeted to molecular mechanism of recurrence is one of the important approach. HCC is a typical hypervascular tumor, its recurrence was associated with tumor angiogenesis. Therefore, anti-angiogenesis may play important role in inhibiting HCC recurrence. It is necessary to establish effective adjuvant treatment to prevent postoperative recurrence and improve prognosis. We investigate the effects of some agents including Droloxifene, Futamine, all-trans retinoic acid and interferon with or without curative resection of primary tumor on metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice (LCI - D20) to verify incidence of intrahepatic recurrence, incidence of lung metastasis and life-span. The results showed that droloxifene and futamin, as well as differentiation inducer all-trans retinoic acid were of no effect on tumor growth and recurrence after curative resection in this experiment. High-dose and long-term therapy with IFN- α significantly inhibits tumor growth and recurrence after resection of HCC in

a dose-dependent manner. The minimal effective dose of IFN- α with preventive effect on recurrent tumor is generally equaled to 5.5 MU tiw in human. The mechanism of IFN- α is anti-angiogenesis and VEGF, but not bFGF, is involved in the effect induced by IFN- α treatment.

目 录

中文摘要	I
Abstract	I
第 1 章 抗转移新途径及新药物的概况	1
第一节 抗转移治疗靶点	1
第二节 抗转移药物的概念及研究	3
参考文献	18
第 2 章 干预不同环节药物对肝癌转移复发和肿瘤生长作用 的初步探索	30
第一节 标化实验动物模型(LCI-D20)	31
第二节 干预不同环节的药物对肝癌转移复发和肿瘤生长作用 的初步探索	34
参考文献	40
第 3 章 IFN- α 预防肝癌转移复发和抑制肿瘤生长的作用	45
第一节 LCI-D20 裸鼠体内应用 IFN- α 对肝癌转移、复发和肿瘤 生长的抑制	46
第二节 IFN- α 对皮下移植肝癌生长的抑制	49
第三节 ATRA 对 IFN- α 抑制肝癌转移复发和肿瘤生长 的协同效应	50
第四节 体内外检测 IFN- α 抑制肝癌血管形成的作用	52
参考文献	59
第 4 章 IFN- α 抑制肝癌血管形成的机制	65
第一节 IFN- α 治疗后血清血管内皮生长因子(VEGF)、碱性 成纤维细胞生长因子(bFGF)水平的变化	66
第二节 IFN- α 治疗对血管内皮生长因子(VEGF)和诱导型一 氧化氮合酶(iNOS)mRNA 表达的影响	69
第三节 IFN- α 治疗后肝癌组织 VEGF、iNOS 表达及微血 管密度(MVD)的变化	71

参考文献	78
第 5 章 干扰素防治肝癌的研究进展	83
第一节 IFN 预防慢性肝炎及其所致肝硬化患者肝癌的发生	84
第二节 IFN 在治疗肝癌上的应用	87
第三节 IFN- α 防治肝癌的机制	90
第四节 干扰素治疗肝癌的副反应	91
第五节 结语与展望	92
参考文献	92

第 1 章

抗转移新途径及新药物的概况

第一节 抗转移治疗靶点

防治肿瘤的转移是改善肿瘤预后的关键。近 30 多年来,肿瘤转移成为国际上关注的课题,在细胞、分子水平对癌侵袭、转移机制的认识已有了长足的进步,为转移防治提供了新思路 and 标靶。抗转移药物的研究成为肿瘤研究的热点(表 1-1)。癌细胞生物学的异质性是癌转移的显著特点,肿瘤细胞亚群具有不同转移特性,转移是一种高度选择的多步骤的非随机过程^[1],有多种复杂因素相互作用和相互依赖,一系列的因素使宿主体内平衡机制发生改变而使每一种肿瘤及相同肿瘤的每一位患者的癌转移呈现特殊性^[2,3]。肿瘤转移的过程基本包括以下步骤^[4]:① 肿瘤组织中特异的细胞亚群逐渐分化增生,其最初的生长营养通过器官的弥散功能提供;② 当肿瘤直径超过 1~2 mm 时,即有新生血管形成供给肿瘤营养,肿瘤合成和分泌的小分子促进血管形成及抑制血管形成,在机体内建立毛细血管网;③ 肿瘤细胞之间及肿瘤与周围组织之间粘附作用的改变以及生成侵袭基底膜、血管及周围器

官所需的蛋白降解酶类使肿瘤细胞进入人体循环;④ 肿瘤细胞在循环内生存并滞留于毛细血管床;⑤ 通过与侵袭相似的机制进入器官实质内并在生长因子的作用下增殖;⑥ 转移瘤逃避宿主的免疫防御机制破坏进而产生新的转移。因此肿瘤转移是一个涉及肿瘤本身及其所处宿主微环境的复杂过程,同时,转移过程的每一个具体的步骤是通过一系列基因的 DNA、RNA 水平暂时或永久性的改变,或者基因的活化、失活来调节,故需从通过对肿瘤转移的分子生物学及病理学过程的认识来设计有效防治措施^[5]。

表 1-1 防治转移的靶点和药物

特异性治疗药物		
靶点	药物举例	作用
生长因子	C225 (anti - EGFR) tyrphostins (anti - RTK)	阻断生长因子信号
细胞粘附	anti - $\alpha v \beta 3$ (vitaxin) $\alpha v \beta 3$ 模拟多肽	阻断细胞与基质的相互作用,可能抑制金属蛋白酶活性
蛋白降解	基质金属蛋白酶抑制剂 (MMPis) 尿激酶型纤溶酶原激活剂受体拮抗剂(uPAR - I)	阻断基质降解、蛋白酶的活化和生长因子
运动	taxanes	阻断微血管 cycling
信号传导	下表	阻断血管生成、侵袭和转移必需的信号传导
信号传导抑制剂		
药物	靶点	作用
CAI	钙离子内流	抑制粘附、运动和血管生成
squalamine	抑制 NHE - 3	抗血管生成
PI3 激酶抑制剂	—	抑制增生、运动
MAPK 抑制剂	—	抑制增生、侵袭

第二节 抗转移药物的概念及研究

随着分子生物学、酶学、药物化学的进展及新的动物转移模型的建立,使设计特异的调节肿瘤转移过程的某一或某些步骤,如肿瘤细胞增生、移动、新生血管生成、蛋白降解及信号传导等环节的临床应用的抗转移药物成为可能。当这些生物学性质特异的、新的药物进入临床,其临床应用、疗效评价与传统的细胞毒性抗肿瘤药物是不同的^[6]。按照其作用机制及途径,抗转移药物可分为以下几类。

一、作用于转移相关生长因子

许多生长因子可刺激肿瘤及内皮细胞从增生到粘附、移动和蛋白降解等一系列生物学行为。因此,它们及其受体是治疗的靶点。生长因子受体拮抗剂有两类:小分子拮抗剂和单克隆抗体。Tyrphostins 是一类能与含酪氨酸激酶的生长因子受体结合的分 子,如结合 EGF、VEGF 和 PDGF 的受体。这类分子作用于生长因子与相应酪氨酸激酶受体上的 ATP 位点相结合部位,从而阻断生长因子的活性^[7],具有受体特异性的这类分子已进入临床试验。例如,选择性作用于 PDGF 受体的 SU101,作用于 VEGF 受体的 PTK 787 和作用于 EGF 受体的 PKI 166^[8,9]。通过直接应用生长因子抗体来干预肿瘤转移的临床试验也在进行,如抗 VEGF 抗体、抗 EGFR 的融合抗体 C225 等,并证实其抗肿瘤和抗肿瘤血管生成作用^[10]。同时,这类药物与传统化疗联合应用时还具有协同作用。

二、抗粘附剂

细胞粘附是肿瘤转移中的重要环节,它包括细胞与细胞之间

及细胞与细胞外基质(ECM)之间的粘附,由细胞表面的粘附分子和细胞外基质中的配体成分相互作用介导。部分药物作用靶点为肿瘤或内皮细胞粘附的临床试验已开展并显示出一定的发展前景。治疗包括单克隆抗体、模拟多肽及其他药物。研究表明抗整合素 $\beta 1$ 亚单位的抗体NCC-INY-7能明显抑制癌细胞粘附于ECM和多种组织,从而阻断肿瘤的侵袭、转移^[11]。前列腺环素及其类似物通过抑制肿瘤细胞粘附于血小板和内皮细胞来阻止肿瘤转移,应用前列腺环素的类似物西卡前列素(cicaprost)可明显抑制大鼠荷SMI2A乳腺癌模型转移的发生,且在转移发生后有较强的减少转移灶数目的作用^[12]。人参皂苷Rg3能抑制高转移的B16-BL6黑色素瘤细胞及结肠癌细胞26-M3.1对ECM中FN和LN的粘附,并呈剂量效应关系,同样能抑制B16-BL6细胞侵袭重组基底膜,体内利用B16-BL6黑色素瘤细胞建立的试验性转移模型显示,接种肿瘤后每只小鼠静脉注射100 mg Rg3,连续4天,可显著减少肺转移和肿瘤新生血管的数量^[13]。

ECM成分包括胶原、糖蛋白,如纤连蛋白(fibronectin, FN)、层粘连蛋白(laminin, LN)、玻璃粘连蛋白(vitronectin, VN)和蛋白多糖(硫酸软骨素、透明质酸)等,一般而言,癌细胞侵袭时,需先由表面粘附分子受体识别ECM配体,进而附着于IV型胶原上,这样粘附于ECM的肿瘤细胞才能不被清除,具有侵袭性。目前,某些被特异识别、结合的ECM氨基酸序列已被确定,包括FN上的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列和亮氨酸-天冬氨酸-缬氨酸(LDV)序列,来自LN酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸(YIGSR)序列。人工合成含有上述序列的多肽可与ECM竞争粘附分子,阻断肿瘤细胞与ECM的粘附,从而抑制肿瘤转移。有较多的文献报道应用含YIGSR和RGD序列的多肽可在体外抑制多种肿瘤细胞的粘附和侵袭,体内抑制多种肿瘤转移。如含RGD氨基酸序列的多肽SC-58448通过阻断整合素 $\alpha v\beta 3$ 与VN的结合,抑制内皮细胞的增殖,呈剂量依赖性,并抑制碱性成